Key Code TSMX7834

www.oxoid.com/ifu

Europe +800 135 79 135 US 1 855 2360 190

CA 1 855 805 8539 ROW +31 20 794 7071

ProSpecT Shiga Toxin E.coli (STEC) Microplate Assay

FR

REF R2474048.....48 Tests

REF R2474096.....96 Tests

1. INDICATION

Le test de détection d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sur microplaque ProSpecT a été conçu pour la détection qualitative des Shiga-toxines (Stx1 et Stx2) dans les extraits aqueux de matières fécales et dans les coprocultures sur bouillon d'enrichissement. Le test a pour fonction d'aider à diagnostiquer les infections par E. coli entérohémorragique (EHEC).

2. RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Les diverses variétés d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont considérées comme des agents étiologiques importants de la diarrhée, responsables de graves épidémieset de cas isolés de colites hémorragiques et de syndrome hémolytiqu eurémique menaçant le pronostic vital [SHU ; 2, 3, 13, 14]. Les souches d'E. coli produisant ces effets ont été décrites pour la première fois par Konowalchuk et son équipe qui ont identifié une cytotoxine ayant un effet cytopathogène sur les cellules Vero d'où son appellation de vérotoxine [VT ; 6, 7, 8]. La proche parenté entre cette cytotoxine et la Shiga-toxine a été mise en évidence par O'Brien et son équipe [9] qui qualifient cette toxine de Shiga-Like (SLT). Deux formes de la toxine ont été identifiées, Stx1 et Stx2 [9], et la production d'une ou des deux cytotoxines par des isolats d'E. coli (STEC) a été démontrée [15, 16]. E. coli O157:H7 est le sérotype d'EHEC le plus fréquemment identifié et il peut être isolé et reconnu par la plupart des laboratoires cliniques [1, 10, 12, 14]. Toutefois, il existe au moins 50 sérotypes d'E. coli associés à la production de cytotoxines et au développement de SHU et/ou de colite hémorragique [5, 11]. Karmali [4] a décrit un teste de cytotoxine permettant la détection de la toxine, mais celui-ci prend beaucoup de temps et exige de grandes compétences techniques de l'opérateur pour confirmer la présence de cytotoxine. Le test de détection d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sur microplaque ProSpecT est un test immuno-enzymatique permettant la détection directe des toxines Stx1 et Stx2 dans les échantillons de selles ou les coprocultures sur bouillon d'enrichissement.

3. PRINCIPES DU TEST

Le test de détection d'E. coli producteurs de Shigatoxines (STEC) ProSpecT est un test immuno-enzymatique en phase solide pour la détection des Shiga-toxines. On dépose les prélèvements de selles dilués dans les puits détachables de la microplaque sur lesquels sont fixés les anticorps polyclonaux de lapin anti-Shigatoxine de type 1 & 2. La toxine éventuellement présente est « capturée » par l'anticorps fixé. Les puits sont incubés puis lavés pour éliminer toute matière non fixée. On ajoute le conjugué enzymatique (anticorps monoclonal de souris anti- Shiga-toxine de type 1 & 2 marqué avec l'enzyme peroxydase de raifort). Les puits sont incubés puis lavés pour éliminer le conjugué enzymatique non fixé. Si la réaction est positive, la toxine fixe l'enzyme dans le puits. On ajoute le substrat de l'enzyme, tétraméthylbenzidine (TMB). Si la réaction est positive, l'enzyme fixée au puits par la toxine convertit le substrat en produit de réaction coloré. La fixation de la couleur peut être détectée visuellement ou à l'aide d'un spectrophotomètre. Si la réaction est négative, il n'y a pas de toxine ou il y en a trop peu pour fixer au puits le conjugué enzymatique et aucun produit de réaction coloré ne se développe.

4. DÉFINITION DES SYMBOLES

REF	Numéro de référence
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro
LAB	Utilisation en laboratoire
	Consulter le mode d'emploi
	Limite de température (température de conservation)
LOT	Code de lot (numéro de lot)
	A utiliser avant le (date de péremption)
	Fabriqué par

5. RÉACTIFS

Le coffret de détection d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sur microplaque ProSpecT comprend suffisamment de réactifs pour effectuer 48 ou 96 tests.

Réactifs:	**48 / 96 TESTS**
Mikrotiterplatte* recouvertes d'anticorps polyclonaux de lapin 6 bandes/12 bandes anti-Shiga-toxine de type 1 & 2	**8 puits par bande** 6 / 12 bandes
Conjugué enzymatique* anticorps monoclonal de souris anti-Shiga-toxines 12 ml/25 ml de type 1 & 2 marqué à la peroxydase de raifort contenant 0,01 % de thiomersal	**1 Flacon** 12 / 25 ml
Contrôle positif surnageant de culture surnageante d'E. coli contenant des 4 ml Shiga-toxines 1 & 2, du sérum bovin foetal, du sérum de lapin et 0,02% de thiomersal	**1 Flacon** 4 ml
Contrôle négatif solution tamponnée contenant du sérum de lapin et 0,02 % de thiomersal	**1 Flacon** 4 ml
Diluant des échantillons bactériens solution tamponnée contenant du sérum de lapin et 0,02 % de thiomersal	**1 Flacon** 110 ml
Tampon de lavage solution tamponnée concentrée 10x contenant 0,1 % de thiomersal	**1 Flacon** 110 ml
Substrat coloré TMB dans le tampon	**1 Flacon** 25 ml
Solution d'arrêt acide sulfurique 1 N	**1 Flacon** 6 ml

*Remarque : Les réactifs provenant de coffrets portant des numéros de lot différents ne sont pas interchangeables.

6. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

IVD Uniquement pour usage diagnostique IN VITRO

6.1. Les réactifs sont fournis dosés prêts à l'emploi à l'exception du concentré de tampon de lavage. Ne pas diluer les réactifs sauf instruction contraire.

6.2. Ne pas utiliser les réactifs après les dates de péremption. Ces dates sont imprimées sur l'étiquette de chaque réactif. L'utilisation de réactifs au-delà de la date de péremption risque d'altérer la précision des résultats.

6.3. La contamination microbienne des réactifs peut diminuer la précision du test. Pour éviter la contamination microbienne des réactifs, utiliser des pipettes stériles à usage unique pour prélever des portions aliquotes dans les flacons de réactif.

6.4. Les réactifs sont préparés à partir de matériaux biologiques et doivent être considérés au cours de leur manipulation comme potentiellement infectieux. Eliminer en respectant les procédures relatives au risque biologique.

6.5. Ne pas prélever de produits dans une pipette par aspiration buccale. Porter des gants jetables et des lunettes de sécurité pendant la manipulation des échantillons et l'exécution du test. Se laver soigneusement les mains à la fin du test.

6.6. Les bandes de microplaques doivent être conservées dans le sachet métallisé refermable pour protéger les micropuits de l'humidité.

6.7. Les échantillons peuvent contenir des agents potentiellement infectieux et doivent être manipulés conformément aux procédures de biosécurité de niveau 2 (BSL 2) exposées dans le manuel publié par le CDC et le NIH (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th Edition).

6.8. Les prélèvements de selles doivent être complètement mélangés avant tout traitement de l'échantillon pour garantir sa parfaite représentativité.

NE PAS CONCENTRER LES ÉCHANTILLONS AVANT LE TEST.

6.9. Le substrat coloré est sensible à l'exposition à la lumière. Tout réactif fixant la couleur lors de son exposition à la lumière doit être jeté.

6.10. Les opérateurs atteints de daltonisme ou de déficience visuelle peuvent avoir des difficultés à interpréter le test visuellement et doivent utiliser les mesures relevées au spectrophotomètre pour interpréter les résultats.

6.11. Jeter le tampon de lavage inutilisé dans un conteneur adapté aux produits présentant un risque biologique.

6.12. Le tampon de lavage (0,1 %), le diluant des échantillons bactériens (0,02 %), le conjugué enzymatique (0,01 %) et les contrôles positif et négatif (0,02 %) contiennent du thiomersal.

6.13. La toxine Shiga 1 et la toxine produite par la souche Shigella dysenteriae de type I (toxine Shiga) sont presque identiques. Par conséquent, le test sur microplaque ProSpecT Shiga Toxin E. Coli (STEC) peut être positif dès lors qu'une quantité détectable de toxine Shiga est présente dans l'échantillion.

7. PRÉPARATION DES RÉACTIFS, STOCKAGE ET MANIPULATION

Avant utilisation, amener tous les réactifs à température ambiante (20 à 25 °C) et mélanger doucement. Remettre les réactifs au réfrigérateur après utilisation.

À l'exception du tampon de lavage, tous les réactifs sont fournis prêts à l'emploi dans des flacons. Les réactifs peuvent être dispensés directement depuis les flacons compte-gouttes ou versés au préalable dans des pipettes multicanaux. Si trop de réactif a été versé, l'excès doit être jeté et ne doit en aucun cas être remis dans le flacon compte-gouttes.

Diluer au dixième le concentré de tampon de lavage 10x en ajoutant un volume de concentré à 9 volumes d'eau distillée ou déminéralisée. Le tampon de lavage dilué reste stable pendant un mois conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C.

La date de péremption de chaque coffret est indiquée sur l'emballage. Conserver tous les composants entre 2 et 8 °C. Les bandes de microplaque inutilisées doivent être conservées dans le sachet métallisé refermable qui contient un agent dessiccatif pour éliminer l'humidité. Le substrat coloré doit être versé directement depuis le flacon protégeant de la lumière dans lequel il est fourni et doit y être conservé entre deux utilisations. Une portion aliquote de substrat coloré prélevée dans le flacon original pour quelque raison que ce soit ne doit en aucun cas y être reversée

8. PRÉLÈVEMENT DES ECHANTILLONS DE SELLES

Les échantillons frais (ou sur milieu de transport de Cary-Blair) doivent être conservés entre 2 et 8 °C ou congelés à une température ne dépassant pas -20 °C immédiatement après le prélèvement. Les échantillons destinés à la mise en culture doivent être placés dans un bouillon une à deux heures après leur réception au laboratoire. Si les cultures ne peuvent pas être réalisées dans ce laps de temps, les échantillons frais ou préservés sur milieu de Cary-Blair doivent être congelés à une température ne dépassant pas 20 °C. Dans le cas de l'analyse directe des selles, les résultats optimaux sont obtenus lorsque le test a lieu dès réception des échantillons au laboratoire. Si le test a lieu dans les 48 heures suivant le prélèvement d'échantillons frais, ou dans les 7 jours pour les échantillons sur milieu de transport de Cary-Blair, les échantillons peuvent être conservés entre 2 et 8 °C, sinon ils doivent être congelés à une température ne dépassant pas -20 °C. Des cycles répétés de congélation-décongélation peuvent entraîner la dégradation de la toxine. Les échantillons dilués dans le diluant des échantillons bactériens peuvent être conservés entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 48 heures avant le test.

9. REMARQUES CONCERNANT LA PROCÉDURE

- Lire attentivement et suivre scrupuleusement toutes les instructions de cette notice.
- Laisser aux réactifs et aux échantillons dilués le temps d'atteindre la température ambiante (20 à 25 °C).
- Respecter le même ordre d'ajout des réactifs dans les puits de test tout au long de la procédure. Pour éviter toute contamination, ne pas toucher le liquide contenu dans les puits avec l'extrémité des flacons.
- Chronométrer avec précision toute période d'attente. Commencer à compter à partir du moment où le réactif a été placé dans le dernier puits de chaque microplaque à tester. Pour assurer la précision du chronométrage, ne pas traiter simultanément plus de trois plaques de 96 puits. Tout écart par rapport à la procédure établie risque de nuire à l'exactitude du test.

10. MODE OPERATOIRE

Éléments nécessaires fournis:

Réactifs
Pipettes de transfert
Porte-bande de microplaque et couvercle
Fiche de procédure avec couleurs de réaction

Éléments nécessaires non fournis:

Récipient pour prélèvements de selles
Minuteur
Pissette pour tampon de lavage
Eau distillée ou déminéralisée

Éléments facultatifs non fournis:

Lecteur de microplaque compatible avec spectrophotomètre étalonné 450 nm ou 450/630 nm
Coton-tige ou bâtonnet applicateur à embout recouvert de rayonne
Micropipette pour les volumes jusqu'à 200 µl
Tubes à essai à usage unique en plastique ou en verre
Mélangeur vortex avec adaptateur de microplaque ou agitateur-secoueur
supplémentaire 110mL Tampon de lavage REF R2450002
supplémentaire 1L Tampon de lavage REF R24500011

11. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR LE TEST

A ANANLYSE DIRECTE DES SELLES

11.A.1. Ajouter 0,6 ml de diluant des échantillons bactériens dans un tube propre de 12 x 75 mm.

11.A.2. Mélanger l'échantillon de selles aussi complètement que possible et diluer comme suit:

11.A.2.A. Selles liquides ou semi-solides : ajouter 0,3 ml (troisième marque à partir de l'embout de la pipette fournie) à l'aide d'une pipette de transfert. Mélanger complètement l'échantillon dans le diluant des échantillons bactériens et laisser la pipette de transfert dans le tube.

11.A.2.B. Selles solides : ajouter 0,3 g (environ 6 mm de diamètre) à l'aide d'un bâtonnet applicateur. Émulsionner l'échantillon dans le diluant des échantillons bactériens et placer une pipette de transfert dans le tube.

11.A.2.C. Les échantillons sur milieu de transport de Cary-Blair doivent être placés directement dans le puits de la microplaque sans autre dilution.

11.A.2.D. Passer l'échantillon en suspension au mélangeur vortex.

B MÉTHODE DU BOUILLON DE CULTURE

11.B.1 Inoculer 50 µl ou 50 µg (volume de la grosseur d'un petit pois) de selles fraîches ou sur milieu de transport de Cary-Blair dans 5 ml de milieu TSB (bouillon trypticase soja), de mTSB (bouillon trypticase soja modifié) ou de bouillon MacConkey.

11.B.2 Incuber à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

11.B.3 Ajouter 0,6 ml de diluant des échantillons bactériens dans un tube propre de 12 x 75 mm.

11.B.4 Transférer 0,3 ml de bouillon de culture dans 0,6 ml de diluant des échantillons bactériens à l'aide d'une pipette de transfert. Laisser la pipette de transfert dans le tube.

12. MODE OPÉRATOIRE

12.1. Ouvrir le sachet métallisé, sortir le nombre requis de bandes de microplaques les et placer sur un porte-bande de microplaque. Utiliser un puits pour le contrôle négatif et un pour le contrôle positif. Si moins de huit puits sont utilisés, détacher des bandes le nombre de puits nécessaires. **REMETTRE LES PUITS INUTILISÉS DANS LE SACHET ET REFERMER LE SACHET HERMÉTIQUEMENT POUR ÉLIMINER L'HUMIDITÉ.**

12.2. Ajouter **4 gouttes** (200 µl) de contrôle négatif dans le premier puits. Ajouter **4 gouttes** (200 µl) de contrôle positif dans un second puits.

12.3. À l'aide d'une pipette de transfert, ajouter **4 gouttes** (200 µl) d'échantillon dilué ou d'échantillon non dilué sur milieu de transport de Cary-Blair par puits.

Remarque : Placer l'embout de la pipette de transfert juste à l'intérieur des puits pour éviter toute éclaboussure dans les puits adjacents.

12.4. Couvrir la microplaque et incuber à température ambiante pendant **60 minutes**. Commencer à chronométrer une fois le dernier échantillon ajouté.

12.5. Vider les puits en les secouant ou en en aspirant le contenu. Laver chaque puits en le remplissant complètement de tampon de lavage dilué (350 à 400 µl par puits). Après chaque lavage, vider les puits de tout liquide en les secouant ou en en aspirant le contenu. Au total, procéder à 3 lavages. Après le dernier lavage, éliminer tout contenu résiduel en tapotant la plaque sur des serviettes en papier propres ou par aspiration. Éliminer autant de tampon de lavage que possible sans jamais laisser les puits s'assécher complètement.

12.6. Ajouter **4 gouttes** (200 µl) de conjugué enzymatique dans chaque puits.

12.7. Couvrir la microplaque et incuber à température ambiante pendant **30 minutes**.

12.8. Transvaser ou aspirer le contenu de chaque puits, puis laver **5 fois** comme à l'étape 5.

12.9. Ajouter 4 gouttes (200 µl) de substrat coloré dans chaque puits.

12.10. **Couvrir** la microplaque et incuber à température ambiante pendant 10 minutes.

12.11. Ajouter 1 goutte (50 µl) de solution d'arrêt dans chaque puits. Tapoter les puits ou utiliser brièvement le mélangeur vortex jusqu'à ce que la couleur jaune soit uniforme. Lire les résultats dans les **10 minutes** suivant l'ajout de la solution d'arrêt.

12.12. Observer les réactions visuellement ou les lire au spectrophotomètre à 450 ou 450/630-650 nm.

13. CONTRÔLE QUALITÉ

Les contrôles positif et négatif doivent être inclus à chaque test. Ils font à la fois office de contrôle des réactifs et de la procédure. Ces contrôles ont pour objet de révéler tout échec substantiel des réactifs. Le contrôle positif ne garantit pas la précision au seuil de positivité.

La densité optique (D.O.) du contrôle négatif doit être <0,100 sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde et < 0,070 sur un spectrophotomètre à deux longueurs d'onde ; le contrôle négatif doit être incolore à l'examen visuel. Si le contrôle négatif présente une couleur jaune d'intensité égale ou supérieure à 1+ sur la fiche de procédure, le test doit être effectué à nouveau en prêtant une attention particulière au lavage.

La D.O. du contrôle positif doit être >0,500 sur un spectrophotomètre à une ou deux longueurs d'onde, et elle doit être égale ou supérieure à la réaction 2+ dans le cas d'une observation visuelle. Si le contrôle positif présente une couleur jaune d'intensité inférieure à 2+ sur la fiche de procédure, prendre contact avec l'assistance technique.

14. RÉSULTATS

Consulter la fiche de procédure jointe pour l'interprétation des couleurs

Examen visuel:

14.1. Observer les résultats en les comparant aux couleurs de réaction de la fiche de procédure.

Positif: couleur jaune d'intensité minimale 1+

Négatif: incolore

Indéterminé: couleur jaune pâle, réaction inférieure à 1+

14.2. Interprétation des résultats visuels:

Positif: Si une couleur jaune d'une intensité au moins égale à 1+ se développe dans le puits, l'échantillon contient la toxine Stx1 ou Stx2 ou les deux et le test est positif.

Négatif: L'absence de couleur révèle un résultat négatif et indique que l'échantillon testé ne contient pas de toxine Stx1 ou Stx2 ou en contient une proportion indétectable.

Indéterminé: Si une couleur jaune pâle d'une intensité inférieure à 1+ se développe, le résultat du test est indéterminé. Dans ce cas, le test doit être répété. Si au second test les résultats sont positifs, l'échantillon est positif. Si les résultats sont négatifs, l'échantillon est négatif. Si les résultats restent indéterminés, obtenir un nouvel échantillon et refaire le test.

Examen au spectrophotomètre:

14.3. Observer les résultats sur une longueur d'onde (450 nm) ou deux longueurs d'onde (450 ou 630-650 nm).

14.4. Lire les résultats du test:

14.4.A. Une longueur d'onde

Positif: D.O > 0.150
Négatif: D.O <0.100
Indéterminé: D.O 0.100-0.150.

14.4.B. Deux longueurs d'onde

Positif: D.O. >0.100
Négatif: D.O. <0.070
Indéterminé: D.O. 0.070-0.100

14.5. Interprétation des résultats enregistrés au spectrophotomètre:

Positif: Une D.O supérieure à 0,150 (une longueur d'onde) ou à 0,100 (deux longueurs d'onde) est un résultat positif indiquant la présence de toxine Stx1 et/ou Stx2.

Négatif: Une D.O. inférieure à 0,100 (une longueur d'onde) ou à 0,070 (deux longueurs d'onde) révèle un résultat négatif et indique que l'échantillon testé ne contient pas de toxine Stx1 ou Stx2 ou en contient une proportion indétectable.

Indéterminé: Une D.O. comprise entre 0,100 et 0,150 (une longueur d'onde) ou entre 0,070 et 0,100 (deux longueurs d'onde) révèle un résultat indéterminé. Dans ce cas, le test doit être répété. Si au second test les résultats sont positifs, l'échantillon est positif. Si les résultats sont négatifs, l'échantillon est négatif. Si les résultats restent indéterminés, obtenir un nouvel échantillon et refaire le test.

Remarque: Si un puits apparaissant limpide à l'examen visuel offre une lecture de D.O. ne coïncidant pas avec l'interprétation visuelle, il faut y rechercher l'existence de bulles ou de petites particules. Les éliminer, essuyer le fond des puits et relire la D.O. Si la divergence persiste, répéter le test.

15. LIMITES DE LA PROCÉDURE:

15.1. La validité des résultats de la détection d'E. coli producteurs de Shigatoxines (STEC) sur microplaque ProSpecT dépend de la conformité de la réaction des contrôles avec les réactions attendues. Voir la section Contrôle qualité.

15.2. Un résultat de test négatif n'exclut pas la possibilité de la présence de Shiga-toxines et peut provenir de la présence dans l'échantillon d'un taux d'antigène inférieur au taux de détection du test. Aucune corrélation n'a été établie entre la quantité d'antigène présente dans un échantillon et la forme clinique.

15.3. Comme pour tout test de diagnostic in vitro, les résultats doivent être interprétés par le clinicien conjointement avec les observations cliniques et/ou les autres résultats de laboratoire.

15.4. La qualité du prélèveùent et du traitement des échantillons est essentielle pour la précision du dosage. Les résultats optimaux sont obtenus sur les échantillons testés aussitôt que possible après le prélèvement. Voir la section prélèvement des échantillons de selles.

Le coffret de détection d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sur microplaque ProSpecT a été classé comme produit hautement complexe.

16. VALEURS ATTENDUES

Il existe au moins 50 sérotypes d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) associés à la production de cytotoxines et au développement de pathologies menaçant le pronostic vital, telles que la colite hémorragique et le syndrome hémolytique urémique (SHU) ; ce dernier est une complication majeure dont les conséquences sont l'insuffisance rénale, la thrombopénie et l'anémie. Bien que les jeunes enfants constituent la population ayant le risque le plus élevé de développer un SHU à cause d'une infection par E. coli producteur de Shiga-toxine, d'autres sous-groupes, tels que les personnes âgées et les patients immunodéprimés sont également menacés par cette infection.

Comme le montrent les résultats des essais cliniques réalisés avec le test de détection d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sur microplaque ProSpecT, un éventail de différents sérotypes étaient présents dans la population testée. La recherche d'infections par STEC ne doit pas se limiter aux tests spécifiques pour la souche O157:H7. Il convient également de remarquer qu'il n'existe pas toujours de corrélation directe entre les résultats des analyses pratiquées directement sur les selles et ceux des analyses avec bouillon d'enrichissement. Les raisons peuvent être les suivantes (liste non limitative):

16.4.A. la toxine peut être présente dans l'échantillon dans une proportion détectable, mais les cellules de STEC ne sont plus cultivables;

16.4.B. les souches isolées d'E. coli O157 dans les coprocultures des patients ont un rapport inversement proportionnel à l'intervalle entre la survenue de la diarrhée et la culture microbiologique [17];

16.4.C. la toxine peut être présente dans l'échantillon dans une proportion indétectable par le test, mais les cellules de STEC sont quand même cultivables ; et

16.4.D. le traitement antibiotique peut influer sur la cultivabilité des cellules de STEC.

17. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Sensibilité et spécificité:

Le test de détection d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sur microplaque ProSpecT a été évalué dans trois centres cliniques géographiquement distincts aux États-Unis, au Canada et en Allemagne, à savoir, respectivement, un hôpital d'un grand centre urbain de Virginie, un hôpital pédiatrique de Toronto et un grand centre de microbiologie. Les populations représentées dans les groupes d'échantillons étaient des patients symptomatiques appartenant à des populations adultes et pédiatriques à prévalence normale. Les échantillons soumis étaient non préservés ; ils ont été analysés avec le test de détection d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sur microplaque ProSpecT en utilisant des échantillons frais et des coprocultures enrichies pendant la nuit. On a également recherché la présence de Shiga-toxines dans tous les échantillons à l'aide d'un test de cytotoxine (CTA). Les échantillons positifs pour la Shiga-toxine ont été isolés et sérotypés (voir tableau 3). Tous les échantillons dont les résultats étaient positifs ou divergents ont été soumis à un test d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) pour usage expérimental seulement afin afin de vérifier la présence du gène de Shigatoxine. Les résultats de chacun des centres sont présentés dans les tableaux 1 et 2. Selon la méthode par analyse directe, il y avait 20 échantillons positifs (EIA+, CTA+, PCR+). Trois étaient EIA-, CTA+, PCR+.

Cinq étaient EIA+, CTA-, PCR-. Tous les résultats indéterminés se sont révélés comme étant de vrais négatifs. Trois cent cinquante-quatre échantillons étaient négatifs selon les deux méthodes (EIA-, CTA-). Les performances avant et après résolution des résultats indéterminés du coffret de détection d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sur microplaque ProSpecT sont présentées ci dessous dans le tableau 1.

Tableau 1. Détection d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sur microplaque ProSpecT comparée à un test de cytoxine réalisé directement sur les échantillons de selles

Analyse directe de l'échantillon

	Résultats initiaux				Résultats résolus*		
ProSpecT	Test de cytotoxine			ProSpecT	Test de cytotoxine		
Centre 1	+	-	Ind.		+	-	Ind.
+	12	2	0	+	12	2	0
-	1	156	4	-	1	161	0
Ind.	0	0	1	Ind.	0	0	0
Total des échantillons:	176				176		
Sensibilité:	92.3%				92.3%		
Spécificité:	98.7%				98.7%		

	Résultats initiaux				Résultats résolus*		
ProSpecT	Test de cytotoxine			ProSpecT	Test de cytotoxine		
Centre 2	+	-	Ind.		+	-	Ind.
+	8	3	0	+	8	3	0
-	2	186	6	-	2	193	0
Ind.	0	0	1	Ind.	0	0	0
Total des échantillons:	206				206		
Sensibilité:	80.0%				80.30%		
Spécificité:	98.4%				98.5%		

	Résultats initiaux				Résultats résolus*		
ProSpecT	Test de cytotoxine			ProSpecT	Test de cytotoxine		
Combinés	+	-	Ind.		+	-	Ind.
+	20	5	0	+	20	5	0
-	3	342	10	-	3	354	0
Ind.	0	1	1	Ind.	0	0	0
Total des échantillons:	382				382		
Sensibilité:	87.0% (66.4-97.2)				87.0% (66.4-97.2)		
Spécificité:	98.6% (96.7-99.5)				98.6% (96.6-99.5)		
Corrélation:	95.0% (92.3-97.0)				97.9% (95.9-99.1)		

Les chiffres entre parenthèses représentent les intervalles de confiance à 95 %.

*Les colonnes « Résultats résolus » contiennent les résultats des tests EIA répétés sur les échantillons qui étaient initialement indéterminés.

Comme le montre le tableau 1, il existe une corrélation de 97,9 % pour la méthode par analyse directe des échantillons en ce qui concerne les données résolues après élimination des résultats indéterminés entre le test de détermination d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sur microplaque et le test de cytotoxine après combinaison des résultats des deux centres.

Selon la méthode des coprocultures sur bouillon d'enrichissement, il y avait 63 échantillons positifs (EIA+, CTA+, PCR+). Trois étaient EIA-, CTA+, PCR-. Après répétition du test CTA, 2 sur 3 se sont révélés comme étant de vrais négatifs. Dix étaient EIA+, CTA-, PCR-. Tous les résultats indéterminés se sont révélés comme étant de vrais négatifs après répétition des tests. Sept cent soixante-et-onze étaient négatifs selon les deux méthodes (EIA-, CTA-). Les performances avant et après résolution des résultats indéterminés du test de détection d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sur microplaque ProSpecT sont présentées ci-dessous dans le tableau 2.

Tableau 2. Détection d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sur microplaque ProSpecT comparés à un test de cytoxine réalisé sur coprocultures sur bouillon d'enrichissement.

Coprocultures sur bouillon d'enrichissement

	Résultats initiaux				Résultats résolus*		
ProSpecT	Test de cytotoxine			ProSpecT	Test de cytotoxine		
Centre 1	+	-	Ind.		+	-	Ind.
+	12	1	0	+	12	1	0
-	0	160	3	-	0	163	0
Ind.	0	0	0	Ind	0	0	0
Total des échantillons:	176				176		
Sensibilité:	100%				100%		
Spécificité:	99.4%				99.4%		

	Résultats initiaux				Résultats résolus*		
ProSpecT	Test de cytotoxine			ProSpecT	Test de cytotoxine		
Centre 2	+	-	Ind.		+	-	Ind.
+	9	0	0	+	9	0	0
-	1	192	4	-	1	196	0
Ind	0	0	0	Ind	0	0	0
Total des échantillons:	206				206		
Sensibilité:	90.0%				90.0%		
Spécificité:	100%				100%		

	Résultats initiaux				Résultats résolus*		
ProSpecT	Test de cytotoxine			ProSpecT	Test de cytotoxine		
Centre 3	+	-	Ind.		+	-	Ind.
+	42	9	0	+	42	9	0
-	2**	410	0	-	0	412	0
Ind.	0	0	0	Ind	0	0	0
Total des échantillons:	463				463		
Sensibilité:	100%				100%		
Spécificité:	97.9%				97.9%		

	Résultats initiaux				Résultats résolus*		
ProSpecT	Test de cytotoxine			ProSpecT	Test de cytotoxine		
Combinés	+	-	Ind.		+	-	Ind.
+	63	10	0	+	63	10	0
-	3	762	7	-	1	771	0
Ind.	0	0	0	Ind.	0	0	0
Total des échantillons:	845				845		
Sensibilité:	95.5% (87.3-99.1)				98.4% (91.6-100)		
Spécificité:	98.7% (97.6-99.4)				98.7% (97.7-99.4)		
Corrélation:	97.6% (96.4-98.5)				98.7% (97.7-99.3)		

Les chiffres entre parenthèses représentent les intervalles de confiance à 95 %.

* Les colonnes « Résultats résolus » contiennent les résultats des tests EIA répétés sur les échantillons qui étaient initialement indéterminés.

** Noter que pour le centre n° 3, il y avait au départ 2 résultats faussement positifs à CTA qui se sont révélés négatifs après répétition du test CTA.

Comme le montre le tableau 2, il existe une corrélation de 98,7 % pour la méthode des coprocultures sur bouillon d'enrichissement en ce qui concerne les données résolues après élimination des résultats indéterminés entre le test de détection d'E. coli producteurs de Shigatoxines (STEC) sur microplaque et le test de cytotoxine après combinaison des résultats de tous les centres.

Divers sérotypes de souches d'E. coli producteurs de Shiga-toxines testés avec le test de détection d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sur microplaque ProSpecT ont réagi à la méthode par analyse directe ainsi qu'à celle des coprocultures sur bouillon d'enrichissement. La liste cidessous recense les sérotypes testés, le nombre d'échantillons réagissant à un sérotype spécifique et, dans la mesure du possible, le type de toxine produit par chaque souche.

Tableau 3. Nombre de sérotypes différents de souches d'E. coli producteurs de Shiga-toxines isolés dans des échantillons positifs.

Sérotype	Anzahl der isolierten Stämme					
Sérotypes	Stx1	Stx2	Stx1&2	Stx2c	Inconnu	Total
O8:H9		1				1
O26:H11	7	2	1		3	13
O30		1				1
O88:H5		1				1
O91	2	1				3
O103:H2	1					1
O111:NM	2	1				3
O118	2					2
O128	2					2
O145	1	1				2
O153:H2	1	1				2
O157:H7		7	9	2		18
O166	1					1
Total des types de toxine	19	16	10	2	3	50

Tableau 4. Tests positifs à la Shiga-toxine en fonction de la consistance des selles

	Consistance des selles					
	Aqueuse	Molle	Muqueuses	Aqueuse/ Muqueuses	Molle/ Muqueuses	Sang
Nombre d'échantillons	119	134	41	17	50	30
Shiga toxine +	8	5	5	0	2	7
Cytotoxine +	10	5	5	1	3	7

Sensibilité analytique: Le test de détection d'E. coli producteurs deShiga-toxines (STEC) ProSpecT permet de détecter environ 52 pg/ml de Stx1 et 126 pg/ml de Stx2.

Reproductibilité: Le coefficient de variation (C.V.) entre tests du coffret de détection d'E. coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sur microplaque ProSpecT a été évalué en sélectionnant un échantillon négatif et trois échantillons positifs présentant des mesures de densité optique variables. Chaque échantillon a été testé dans 24 puits par session pendant trois jours consécutifs. Le C.V. moyen entre tests était de 8,69 %.

Échantillon	D.O. moyenne	Écart type	C.V.%
1	0.065	0.0101	15.61
2	0.264	0.0176	6.67
3	0.675	0.0270	4.00
4	0.830	0.0703	8.48

Le C.V. intra-test a été évalué en testant 24 puits contenant chacun 4 échantillons. Le C.V. moyen intra-test était de 4,59 %.

Échantillon	D.O. moyenne	Écart type	C.V.%
1	0.069	0.0055	8.01
2	0.274	0.0134	4.90
3	0.563	0.1490	2.65
4	1.226	0.0340	2.78

Réactivité croisée: Aucune réaction croisée n'a été constatée lorsque divers germes de la microflore du côlon humain ont été analysés avec le test de détection d'E. coli producteurs de Shiga toxines sur microplaque ProSpecT. Les tests ont été réalisés en ensemençant des germes, dont la liste figure ci-dessous, dans des échantillons de selles négatifs et positifs pour la Shiga-toxine. Les bactéries ont été ensemencées à des concentrations >1 x 107 UFC/ml d'échantillon.

Des souches pathogènes d'E. coli non producteurs de Shiga-toxines (EPEC, ETEC, EIEC) ont également été analysées avec le test ProSpecT et se sont révélées négatives.

Campylobacter jejuni ATCC 29428
Klebsielia pneumoniae ATCC 27736
Citrobacter braaki ATCC 43162
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Enterobacter cloacae ATCC 13047
Proteus vulgarus ATCC 33420
Enterococcus faecalis ATCC 49149
Salmonella typhimurium SA972229
Escherichia coli, VT negative, ATCC 25922
Serratia liquefacians ATCC 27592
Escherichia coli, EPEC, ATCC 12014 (O55:NM)
Shigella dysenteriae ATCC 49347
Escherichia coli, EPEC, ATCC 33780 (O111:NM)
Shigella flexneri ATCC 25929
Escherichia coli, ETEC/ EPEC, ATCC 43887 (O111:NM)
Shigella sonnei ATCC 25931
Escherichia coli, EIEC, ATCC 43893 (O124:NM)
Staphylococcus aureus ATCC 25923
Escherichia coli ATCC 33660
Yersinia enterocolitica ATCC 2371516

18. BIBLIOGRAPHIE

18.1. Johnson, W.M., H. Lior, and G.S. Bezanson, 1983. "Cytotoxic Escherichia coli O157:H7 Associated with Haemorrhagic Colitis in Canada." Lancet pp. 76.

18.2. Karmali, M.A., B.T. Steele, M. Petric, and C. Lim, 1983. "Sporadic Cases of Haemolytic Uremic Syndrome Associated with Faecal Cytotoxin and Cytotoxin-Producing Escherichia coli." Lancet pp.619-620.

18.3. Karmali, M.A., M. Petric, C. Lim, P.C. Fleming, G.S. Arbus, and H. Lior, 1985. "The Association Between Haemolytic Uremic Syndrome and Infection by Verotoxin-Producing Escherichia coli." J. Infect. Dis. 151(5): 775-782.

18.4. Karmali, M.B., 1987. "Laboratory Diagnosis of Verotoxin-Producing Escherichia coli Infections." Clin. Microbiol. Newsletter. 9(9): 65-70.

18.5. Kleanthous, H., H.R. Smith, S. M. Scotland, R.J. Gross, B. Rowe, C. M. Taylor, and D.V. Milford. 1990. "Haemolytic uraemic syndrome in the British Isles, 1985-8: association with Verocytotoxin producing Escherichia coli. Part 2. Micriobiological aspects." Am. J. Dis. Child. 65:722-727.

18.6. Konowalchuk, J., I. Speirs, and S. Stavric. 1977. "Vero Response to a Cytotoxin of Escherichia coli." Infect. Immun. 18(3): 775-779.

18.7. Konowalchuk, J., N. Dickie, S. Stavric, and J.I. Speirs. 1978, "Properties of an Escherichia coli Cytotoxin." Infect. Immun. 20: 575-577.

18.8. Konowalchuk, J., N. Dickie, S. Stavric, and J.I. Speirs, 1978. "Comparative Studies of Five Heat-labile Toxic Products of Escherichia coli." Infect. Immun. 22:644-648.

18.9. O'Brien, A.D., G.D. LaVeck, M.R. Thompson, and S.B. Formal, 1982. "Production of Shigella dysenteriae type 1-like Cytotoxin by Escherichia coli." J. Infect. Dis. 144(6):763-769.

18.10. O'Brien, A.D., T.A. Lively, M.E. Chen, S.W. Rothman, and S.B. Formal, 1983. "Escherichia coli O157:H7 Strains Associated with Haemorrhagic Colitis in the United States Produce a Shigella dysenteriae I (Shiga)-like Cytotoxin." Lancet pp.702.

18.11. O'Brien, A.D. and R.K. Holmes. 1987. "Shiga and Shiga-like Toxins." Microbiol. Rev. 51(2): 206-220.

18.12. Pai, C.H., R. Gordon, H.Y. Sims, and L.E. Bryan, 1984. "Sporadic Cases of Haemorrhagic Colitis Associated with Escherichia coli O157:H7." Ann. Intern. Med. 101: 738;-742.

18.13. Pai, C. H., N. Ahmed, H. Lior, W.M, Johnson, H.V. Sims, and D.E. Woods, 1988. "Epidemiology of Sporadic Diarrhoea Due to Verocytotoxin-Producing Escherichia coli; A Two-year Prospective Study." J. Infect. Dis. 157(5):1054-1057.

18.14. Riley, L.W., R.S. Remis, S.D. Helgerson, H.B. McGee, J.G. Wells, B.R. Davis, R.J. Hebert, E.S. Olcott, L.M. Johnson, N.T. Hargrett, P.A. Blake, and M.L. Cohen, 1983. "Haemorrhagic Colitis Associated with a Rare Escherichia coli Serotype." N. Engl. J. Med. 308(12): 681-685.

18.15. Scotland, S.M., H.R. Smith, and B. Rowe, 1985. "Two Distinct Toxins Active on Vero Cells from Escherichia coli O157." Lancet. pp.885-886.

18.16. Strockbine, N., L. Marques, J. Newland, H. Williams Smith, R.K. Holmes, and A.D. O'Brien, 1986. "Two Toxin-Producing Phages from Escherichia coli O157:H7 Strain 933 Encode Antigenically Distinct Toxins with Similar Biologic Activities." Infect. Immun. 53(1):135-140.

18.17. Karch, H., et al., 1996. "Isolation of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157 Strains from Patients with Hemolytic-Uremic Syndrome by Using Immunomagnetic Separation, DNA-Based Methods, and Direct Culture." JCM, March 1996, 34(3):516-519.

CE

IFU X7834, révisé Mai 2012

Remel Europe Ltd
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT
UK

Pour une assistance technique, contacter le distributeur local